

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-100262

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)5月19日

A 61 M 1/36

6675-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 保存安定性の改良された体外循環治療用吸着カラム

⑯ 特 願 昭59-221862

⑰ 出 願 昭59(1984)10月22日

⑱ 発 明 者 谷 紋 孝 箕面市船場西2-11-1 ロイヤル千里105号

⑲ 発 明 者 奥 山 勉 神戸市垂水区塩屋町6-31-17 三青荘

⑳ 発 明 者 古 吉 重 雄 神戸市垂水区塩屋町6-31-17 三青荘

㉑ 出 願 人 鐘淵化学工業株式会社 大阪市北区中之島3丁目2番4号

㉒ 代 理 人 弁理士 朝日奈 宗太

明 細 書

1 発明の名称

保存安定性の改良された体外循環治療用吸着カラム

2 特許請求の範囲

- 1 硫酸化多糖類を水不溶性担体に固定した吸着体および緩衝作用を有する化合物を 0.001 ~ 10重量%含有する pH5 ~ 8.5 の内容液を充填したことを特徴とする保存安定性の改良された体外循環治療用吸着カラム。
- 2 前記内容液が緩衝作用を有する化合物を 0.01 ~ 2重量%含有する特許請求の範囲第1項記載の体外循環治療用吸着カラム。
- 3 緩衝作用を有する化合物がクエン酸、リン酸、酢酸、ホウ酸、酒石酸、炭酸、マレイン酸、グリシンまたはそれらの塩の少なくとも1種である特許請求の範囲第1項または第2項記載の体外循環治療用吸着カラム。

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は保存安定性の改良された体外循環治療用吸着カラムに関する。

〔従来の技術〕

従来より、硫酸化多糖類を水不溶性担体に固定した吸着体を、水を内容液としてカラムに充填して体外循環治療用吸着カラムが製造され、使用されている。

水を内容液として使用するのは、安全性の理由から、製造された吸着体が通常蒸気風固されるため、ぬれた状態で吸着体がえられ、水を内容液として用いると乾燥させたりする必要がないこと、および体外循環治療用吸着カラムに用いるにあいには、必ず一旦水を内容液としたのち使用されることなどの理由による。

製造された体外循環治療用吸着カラムは、長いはあいには約1年程度保存したのち使用されることもあるので、少なくとも1年程度性能を保持することが必要である。

〔発明が解決しようとする問題点〕

硫酸化多糖類を水不溶性担体に固定し、水を内容液としてカラムに充填して製造した体外循環治療用吸着カラムを長期間保存すると、固定された硫酸化多糖類が加水分解されたりして脱離したりする。加水分解が進行すると硫酸系化合物が生成するため、さらに加水分解が加速される。その結果、固定された硫酸化多糖類の量が減少し、体外循環治療用吸着カラムの性能が低下する。

本発明は前記のごとき問題を解決するためになされたものである。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明は硫酸化多糖類を水不溶性担体に固定した吸着体および緩衝作用を有する化合物を0.001~10%（重量%、以下同様）含有するpH5~8.5の内容液を充填したことを特徴とする体外循環治療用吸着カラムに関する。

〔実施例〕

本発明に用いる硫酸化多糖類としては、た

例えばヘパリン、デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸、コンドロイチンポリ硫酸、ヘパラン酸、ケラタン硫酸、ヘパリチン硫酸、キシラン硫酸、カロニン硫酸、セルロース硫酸、キチン硫酸、キトサン硫酸、ペクチン硫酸、イヌリン硫酸、アルギン酸硫酸、グリコーゲン硫酸、ポリラクトース硫酸、カラゲニン硫酸、デンプン硫酸、ポリグルコース硫酸、ラミナリン硫酸、ガラクトン硫酸、レバン硫酸、メベサルフェートなどがあげられるが、これらに限定されるものではなく、一般に体外循環治療用吸着体の製造に用いられる硫酸化多糖類であれば使用しうる。前記硫酸化多糖類の具体例のうちでは、ヘパリン、デキストラン硫酸、コンドロイチンポリ硫酸がの点から好ましい。

本発明に用いる水不溶性担体としては、たとえば通常アフィニティークロマトグラフィーに用いられる担体であるアガロース、デキストラン、ポリアクリルアミドなどの軟質ゲル、多孔質ガラス、多孔質シリカなどの無機多孔体、合

成高分子からなるポリマーゲル、多孔質セルロースゲルなどがあげられるが、これらに限定されるものではない。これらのうちでは無機多孔体、ポリマーハードゲルなどの硬質ゲルが十分な体液流量がえられる、詰まりを生じにくいなどの理由から好ましく、とりわけ多孔質セルロースが、

- (1)機械的強度が比較的高く、強弱であるため攪拌などの操作により破壊されたり微粉を生じたりすることが少なく、カラムに充填したばいに体液を高流速で流しても圧密化したり、目詰まりしたりしないので高流速で流すことが可能となり、また細孔構造が高圧蒸気滅菌などによって変化を受けにくい、
- (2)ゲルがセルロースで構成されているため親水性であり、硫酸化多糖類の結合に利用しうる水酸基が多数存在し、非特異吸着も少ない、
- (3)空孔容積を大きくしても比較的強度が高いため、軟質ゲルに劣らない吸着容量がえられる、
- (4)安全性が合成高分子ゲルなどに比べて高い

などの優れた点を有しており、該多孔質セルロースゲルに硫酸化多糖類を保持させることによって、高流速で選択的に有害成分を吸着除去しうる吸着体がえられる。なお多孔質セルロースゲルを用いた吸着体については特願昭58-68116号明細書に詳細に記載されている。

本発明においては硫酸化多糖類を水不溶性担体に固定して体外循環治療用吸着体が製造される。

水不溶性担体に硫酸化多糖類を固定させる方法には公知の種々の方法を用いることができる。すなわち、物理的方法、イオン結合法、共有結合法などがあげられる。固定化された硫酸化多糖類は脱離しにくいことが重要であるため、結合の強固な共有結合法が好ましく、その他の方法を用いるにしても脱離を防ぐようにすることが好ましい。また必要に応じてスパーザーを水不溶性担体と硫酸化多糖類との間に導入してもよい。

本発明においてはこのようにして製造された

体外循環治療用吸着体が、通常 121℃で20分間程度の条件で、水性溶媒中で蒸気滅菌法により滅菌され、緩衝作用を有する化合物を 0.001~10%、好ましくは 0.01~2% 含有する pH5~8.5 の内容液とともに所定のカラムに充填して、本発明の体外循環治療用カラムが製造される。

蒸気滅菌する際の水性溶媒は通常は水であるが、本発明に用いる緩衝作用を有する化合物を 0.001~10% 程度、好ましくは 0.01~2% 程度含有する pH5~8.5 の内容液として用いる液を水性溶媒として用いてもよい。前記内容液として用いる液を蒸気滅菌する際の水性溶媒として用いると、蒸気滅菌時に生ずる pH 変化にもとづく性能低下が少なくなり好ましい。また水性溶媒が内容液としてそのまま使用しうる。

前記緩衝作用を有する化合物としては、たとえばクエン酸、リン酸、酢酸、ホウ酸、酒石酸、炭酸、マレイン酸、グリシンなど、あるいはこれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩などのように人体に安全なものが好ましく、

これらは単独で用いてもよく、2種以上混合して用いてもよい。

前記内容液中にしめる緩衝作用を有する化合物の量が 0.001% 未満になると、内容液の pH を長期間にわたって 5~8.5 の範囲に維持することができなくなり、また 10% をこえると、体外循環治療用吸着カラムを使用するために行なう洗浄に時間がかかったり、保存中に緩衝作用を有する化合物が析出したりする。

前記内容液の pH が 5 未満になると、長期間保存したばあいには吸着体の吸着活性の低下が著しくなったり、固定された硫酸化多糖類の加水分解による脱離が著しくなったりする。また pH が 8.5 をこえても pH 5 未満と同様の現象が生じる。なお pH 5 未満のばあいには吸着体の吸着活性の低下が主としておこり、pH 9 をこえるばあいには硫酸化多糖類の加水分解による脱離が主としておこり、いずれも吸着体性能が低下する。

このようにして製造された本発明の滅菌された体外循環治療用吸着カラムは、通常の体外循

環治療用吸着カラムが用いられる、たとえば血液、血漿などを吸着カラムに通して行なう体外循環治療などの用途に限定なく使用しうる。

つぎに本発明の体外循環治療用吸着カラムを実施例にもとづき説明する。

製造例 1

架橋ポリアクリレートゲル（全多孔性のハードゲル）であるトヨパール HM75（蛋白質の排除限界 50,000,000、粒径 50~100 μ m、東洋曹達製）10 ml に飽和 NaOH 水溶液 6 ml およびエピクロルヒドリン 15 ml を加えて攪拌しながら、50℃で 2 時間反応させ、エポキシ化ゲルをえた。えられたゲルに塩アンモニア水 20 ml を加えて 50℃で 2 時間攪拌し、アミノ基を導入した。

一方、ヘパリン 200 mg を 10 ml の水に溶解して pH4.5 に調整したのち、上記アミノ基を導入したゲル 3 ml を加えた。そののち 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド 200 mg を pH を 4.5 に保ちながら添加し、4℃で 24 時間反応した。反応終了後、2N 食塩水溶液、

0.5N 食塩水溶液、水を用いてこの順に洗浄し、ヘパリン固定化ゲル（以下、A-1 という）をえた。

製造例 2

架橋ポリアクリレートゲルであるトヨパール HM75 10 ml に、飽和 NaOH 水溶液 6 ml およびエピクロルヒドリン 15 ml を加えて攪拌しながら、50℃で 2 時間反応させたのち、ゲルをアルコールおよび水を用いてこの順に洗浄してエポキシ化されたゲルをえた。

えられたゲル 2 ml に極限粘度数 0.055dl/g、平均重合度 40、硫酸含量 19% のデキストラン硫酸ナトリウム 0.5 g および水 2 ml を加えた（デキストラン硫酸ナトリウムの濃度は約 13%）。ついで pH12 に調整して 40℃で 16 時間振盪し、ゲルを濾別し、2N 食塩水溶液、0.5N 食塩水溶液、水を用いてこの順に洗浄して、デキストラン硫酸ナトリウムが固定されたゲル（以下、A-2 という）をえた。

製造例 3

デキストラン硫酸をヘパリンにかえたほかは製造例2と同様にしてヘパリンが固定されたトヨパールHM75(以下、A-3という)をえた。

製造例4

多孔質ガラスFPG2000(平均粒径1950Å、比表面積13ml/g、粒径80~120メッシュ、和光純薬(株)製)を希硝酸中で3時間加熱し、水洗乾燥後500℃で3時間加熱したのち、γ-アミノプロピルトリエトキシシランの10%トルエン溶液の中に入れ、3時間還流し、メタノールで洗浄して、γ-アミノプロピル処理ガラスをえた。

一方、ヘパリン200gを10%の水に溶解し、pH4.5に調整した。これに2gのγ-アミノプロピル処理ガラスを加えたのち、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド200gをpH4.5に保ちながら添加し、4℃で24時間振盪した。反応終了後、2M食塩水溶液、0.5M食塩水溶液、水を用いてこの順に洗浄し、ヘパリンが固定された多孔質ガラス(以下、B-1という)をえた。

の10%トルエン溶液の中に入れ、3時間還流し、メタノールで洗浄してア-グリシドキシプロピル処理ガラスをえた。

一方、デキストラン硫酸2gを10%の水に溶解し、pH9.2に調整したのち、これに2gの上記ア-グリシドキシプロピル処理ガラスを加えて45℃で18時間反応させた。反応終了後2M食塩水溶液、0.5M食塩水溶液、水を用いてこの順に洗浄し、デキストラン硫酸を固定したFPG2000(以下、B-4という)をえた。

製造例8

多孔質セルロースゲルとしてCKゲルA-3(排除限界分子量50,000,000、粒径45~105μm、チソ(株)製)10%に20%NaOH4g、ヘプタン12gおよびノニオン系界面活性剤TWEEN20を1滴加えた。40℃で2時間攪拌後、エピクロルヒドリン5gを加えて2時間攪拌し、ゲルを水洗濾過してエポキシ化セルロースゲルをえた。導入されたエポキシ基の量はカラム体積1mlあたり30μMであった。

製造例5

ヘパリンをコンドロイチンポリ硫酸にかえたほかは製造例4と同様にしてコンドロイチンポリ硫酸を固定したFPG2000(以下、B-2という)をえた。

製造例6

デキストラン硫酸800gを0.25M NaIO₄溶液10%に溶解し、室温で4時間攪拌後、エチレングリコール200gを加えて1時間攪拌した。この溶液をpH8に調整したのち、製造例4と同様にしてえられたγ-アミノプロピル処理FPG20004%を加え、24時間振盪した。反応終了後、ゲルを濾別、水洗し、これを1%NaBH₄水溶液10%に懸濁して15分間還元し、濾過、水洗してデキストラン硫酸を固定したFPG2000(以下、B-3という)をえた。

製造例7

多孔質ガラスFPG2000を希硝酸中で3時間加熱し、水洗後500℃で3時間加熱した。これをア-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン

えられたゲル2%に極限粘度数0.027dl/g、硫黄含量17.7%のデキストラン硫酸ナトリウム

0.12gおよび水2%を加え(デキストラン硫酸ナトリウムの濃度は約2.5%)、pH11に調整して45℃で18時間振盪した。そののちゲルを濾別して、2M食塩水溶液、0.5M食塩水溶液および水を用いてこの順に洗浄し、デキストラン硫酸ナトリウムが固定されたセルロースゲル(以下、C-1という)をえた。

製造例9

CKゲルA-3を吸引濾過して10gとり、これに20%NaOH4gおよびヘプタン12gを加え、さらにノニオン系界面活性剤TWEEN20を1滴加えて攪拌し、ゲルを分散させた。40℃で2時間攪拌後、これにエピクロルヒドリン5gを加えて40℃で2時間攪拌した。静置後上澄液をすて、ゲルを水洗濾過してエポキシ化ゲルをえた。これに15%の濃アンモニア水を加えて40℃で1.5時間攪拌し、内容物を吸引濾過、水洗してアミノ基の導入されたセルロースゲルをえた。

一方、ヘパリン 200mg を 10 ㊺の水に溶解し、これに上記アミノ基導入セルロースゲルを加えて pH4.5 に調整した。そのうち 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド 200mg を pH4.5 に保ちながら添加し、4℃で 24 時間振盪した。反応終了後、2N 食塩水溶液、0.5N 食塩水溶液、水を用いてこの順に洗浄し、ヘパリン固定化ゲル（以下、C-2 という）をえた。

製造例 10

デキストラン硫酸をコンドロイチンポリ硫酸にかえたほかは製造例 8 と同様にしてコンドロイチンポリ硫酸が固定された CK ゲル A-3（以下、C-3 という）をえた。

製造例 11

デキストラン硫酸をヘパリンにかえたほかは製造例 8 と同様にしてヘパリンの固定された CK ゲル A-3（以下、C-4 という）をえた。

実施例 1～14 および比較例 1～7

製造例 1～11 でえられた第 1 表に示すゲル

（吸着体）10g（湿重量）を硬質ガラス製フラスコにとり、第 1 表に示す内容液 10 ㊺を加え、密栓して 40℃ の恒温槽中に 2 カ月間おいた。

各吸着体につき放置前、放置後の内容液の pH、放置後の内容液への溶出物量および放置前、放置後の担体に固定されているリガンド量を測定した。結果を第 1 表に示す。

[以下余白]

第 1 表

実施例番号	吸着体	内 容 液	pH		リガンド量 (mg/ml)		溶出物量 (mg)
			前	後	前	後	
比較例 1	A-1	水	7.5	5.5	2.6	2.0	25
1	A-1	1/30M リン酸バッファ	7.4	7.4	2.6	2.5	15
比較例 2	A-2	水	7.2	2.6	1.2	0.20	30
2	A-2	1/30M リン酸バッファ	7.4	7.35	1.2	1.15	20
比較例 3	B-1	水	7.6	5.5	1.5	1.10	35
3	B-1	1/30M リン酸バッファ	7.35	7.4	1.5	1.45	25
比較例 4	B-4	水	7.0	3.5	1.55	0.20	65
4	B-4	1/30M リン酸バッファ	7.3	7.4	1.55	1.45	24
比較例 5	C-1	水	7.5	3.15	2.4	0.35	78
5	C-1	1/30M リン酸バッファ	7.4	7.45	2.4	2.25	35
比較例 6	C-3	水	7.2	3.5	2.35	0.40	72
6	C-3	1/30M リン酸バッファ	7.4	7.25	2.35	2.15	31
比較例 7	C-4	水	7.0	5.25	2.4	1.75	54
7	C-4	1/30M リン酸バッファ	7.4	7.45	2.4	2.3	23
8	C-1	0.05% クエン酸ナトリウム	7.65	7.4	2.4	2.25	28
9	C-1	0.1% 炭酸水素ナトリウム	6.4	6.4	2.4	1.95	56
10	C-1	1/30M 炭酸ナトリウム	7.8	7.8	2.4	2.05	46
11	C-1	バッファ 1/20M キウ酸-炭酸 ナトリウムバッファ	7.4	7.1	2.4	2.25	30
12	C-1	0.05% 炭酸ナトリウム	7.8	7.6	2.4	2.10	32
13	C-1	0.05% グリシン	6.5	6.3	2.4	2.2	25
14	C-1	0.05% クエン酸ナトリウム -クエン酸バッファ	6.3	6.2	2.4	2.35	21

【発明の効果】

本発明の体外循環治療用吸着カラムは通常の保存条件よりもきびしい40℃という条件で2カ月間保存しても、リガンドの脱離および溶出物量などが少なく、体外循環治療用吸着カラムとして良好な品質を保持している。

特許出願人 鐘淵化学工業株式会社

代理人弁理士 朝 日 宗 太

